# **PCT**

## WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

# INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:
C07H 21/00
A2
(43) Internationales
Veröffentlichungsnummer: WO 00/49031
Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01028

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Februar 2000 (09.02.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 07 023.7 19. Februar 1999 (19.02.99) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PODSZUN, Wolfgang [DE/DE]; Roggendorfstrasse 55, D-51061 Köln (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse 11, D-50937 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUCLEINSÄUREN

#### (57) Abstract

Nucleic acids can be efficiently adsorbed on specific water-insoluble pearl polymers with an average size of 3 to 100  $\mu$ m, at a neutral or acidic pH value. The acids can then be liberated at an alkaline pH with high yields.

#### (57) Zusammenfassung

Nucleinsäuren können bei neutralem und saurem pH-Wert an speziellen wasserunlöslichen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengrösse von 3 bis  $100~\mu m$  effizient adsorbiert werden und bei basischen pH-Werten in hoher Ausbeute wieder freigesetzt werden.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	ТJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
$\mathbf{BF}$	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
$\mathbf{BG}$	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		50200
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
$\mathbf{E}\mathbf{E}$	Estland	LR	Liberia	$\mathbf{SG}$	Singapur		

## Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren

5

10

15

30

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtrennen und selektiven Freisetzen von Nucleinsäuren unter Verwendung spezieller Perlpolymerisate.

In jüngster Zeit gewinnt die sogenannte Gen-Diagnostik zunehmend an Bedeutung. Die Gen-Diagnostik hat Eingang gefunden in die Diagnostik humaner Erkrankungen (u.a. Nachweis von Infektionserregern, Nachweis von Mutationen des Genoms, Analyse von zirkulierenden Tumorzellen und Identifizierung von Risikofaktoren für die Prädisposition einer Erkrankung). Aber auch in der Veterinärmedizin, der Umweltanalytik und Nahrungsmitteltestung findet die Gen-Diagnostik mittlerweile ihre Anwendung. Ein weiteres Anwendungsgebiet stellen Untersuchungen an Pathologischen-/Zytologischen Instituten oder im Rahmen forensischer Fragestellungen dar. Aber auch im Rahmen der Qualtitäts- und Prozesskontrolle (beispielsweise Untersuchungen von Blutproben auf Infektionserreger-Freiheit) wird die Gen-Diagnostik mittlerweile eingesetzt und der Gesetzgeber plant, die Zahl der heute schon vorgeschriebenen Tests per Gesetz in Zukunft zu erweitern.

- Methoden, die bei der Gen-Diagnostik zum Einsatz kommen (wie z.B. Hybridisierungs- oder Amplifikationstechniken wie die PCR, bDNA oder NASBA, TMA Technologie) gehören auch bei wissenschaftlichen Grundlagenarbeiten zu den Routineverfahren.
- Durch die zunehmende Verbreitung nicht-radioaktiver Detektionsverfahren, die auch im Rahmen der Gen-Diagnostik eine Rolle spielen, ist zu erwarten, daß die Gen-Diagnostik in Zukunft noch weitere Verbreitung als zur Zeit finden wird.
  - Bei der Gen-Diagnostik ist die Gewinnung von Gen-Proben aus biologischem Material wie Zellen, Blut, Sputum, Liquor, Serum oder Urin ein wichtiger Teilschritt.

10

15

20

25

30

- 2 -

PCT/EP00/01028

Die Bindung von Nucleinsäuren an polyquarternäre kationische Polymere ist aus der US-A-4 046 750 bekannt. Allerdings ist die Bindung irreversibel, so daß bei dieser Methode die adsorbierten Nucleinsäuren nicht wieder freigesetzt werden können.

Die US-A-4 055 469 offenbart eine Methode zur Reinigung von Enzymen, wobei Nucleinsäuren und unerwünschte Proteine mit Hilfe wasserlöslicher kationischer Polymere ausgefällt werden.

Aus der US-A-4 839 231 sind mit Vinylpyridinpolymer beschichtete Träger bekannt, die Proteine und Nucleinsäuren adsorbieren können. Allerdings ist die Kapazität der Träger recht niedrig und die Adsorption der Nucleinsäuren nicht quantitativ.

Die WO-A-91/05606 beschreibt ein silanisiertes, poröses Trägermaterial mit Hydroxyalkylaminogruppen für die chromatographische Trennung von Nucleinsäuren. Dieses Material ist jedoch zum schnellen und möglichst quantitativen Abtrennen von Nucleinsäuren aus biologischem Material weniger gut geeignet.

In der DE-A-4 139 664 wird eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren mit Hilfe von Anionenaustauschern beschrieben. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, daß die Desorption der Nucleinsäuren vom Anionenaustauscher nur mit Pufferlösungen hoher Ionenstärke gelingt und die Abtrennung der Salze aus der Pufferlösung zusätzliche Präparationsschritte erfordert.

Die DE-A-4 333 805 beansprucht die Extraktion von Nucleinsäuren aus einer Probe mit Hilfe von wasserlöslichen Trägern wie Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose und weiteren Reagenzien, wobei die Nucleinsäuren ausgefällt werden.

In der EP-A-0 707 077 (entspricht der US-A-5 582 988) wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren aus biologischem Material unter Verwendung von löslichem, schwach basischem Polymer beschrieben. Bei dieser Methode wird in einem sauren pH-Bereich ein Fällungsprodukt aus dem löslichen, schwach basischen

- 3 -

PCT/EP00/01028

Polymer und der Nucleinsäure erzeugt, das Fällungsprodukt von den nicht gefällten Bestandteilen des biologischen Materials abgetrennt und gewaschen und die Nucleinsäure aus dem Fällungsprodukt durch Einstellung eines basischen pH-Wertes wieder freigesetzt.

5

Ein Nachteil der Methoden nach DE-A-4 333 805 und EP-A-0 707 077 besteht darin, daß die Handhabung, insbesondere die Abtrennung und Reinigung des Fällungsproduktes schwierig und sehr zeitaufwendig ist. Diese Methoden lassen sich auch nicht bzw. nur unter erschwerten Bedingungen mit Hilfe automatisierter Analysegeräte ausführen.

Die WO-A-96/18731 beschreibt eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren mit Hilfe eines Detergenz und eines festen Trägers. Da feste Träger ohne Poren und ohne Quellbarkeit eingesetzt werden, ist die Bindungskapazität der Träger relativ gering.

15

10

In der WO-A-97/08547 wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren beschrieben, bei der die Nucleinsäuren an einem festen hydrophilen organischen Polymer ohne effektive positive Ladung, beispielsweise an Cellulose, gebunden werden. Bei dieser Methode erfolgt die Bindung über schwache Kräfte, wie Van der Waals Wechselwirkungen.

25

20

Die WO-A-97/34909 beschreibt eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren unter Verwendung eines speziellen teilchenförmigen Polymerisates mit einer unteren kritischen Löslichkeitstemperatur (lower critical solubility temperature, LCST) von 25-45 °C. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß zur Freisetzung der Nucleinsäuren Puffer mit hohen Ionenstärken, die bei der weiteren Verwendung der Nucleinsäuren stören können, angewendet werden müssen. Wegen der geringen Größe der verwendeten Partikel von 0,05 bis 2 μm ist zudem die Verarbeitung zeitaufwendig und schwierig zu automatisieren.

Trotz der zahlreichen vorbeschriebenen Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren besteht noch immer ein dringender Bedarf für eine einfache, möglichst automatisierbare Methode zur effektiven Abtrennung und Wiederfreisetzung von Nucleinsäuren aus biologischem Material.

5

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß bestimmte in Wasser unlösliche Perlpolymerisate polymerisierter Einheiten von Aminomonomer, Vernetzer und Vinylmonomer in hervorragender Weise zur Isolierung von Nucleinsäuren geeignet sind.

10

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die nachfolgenden Schritte

- A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,
  - B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates und
- 20 C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,
- dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist und aus polymerisierten Einheiten von
  - a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
- 30 c) 0 bis 93 Gew.-% Vinylmonomer

besteht.

Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischenschritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials.

5

20

25

Bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die Schritte

- A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,
  - B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates und
- 15 C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,
  - dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m²/g ist und aus polymerisierten Einheiten von
    - a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
    - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, das aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer
- 5 besteht.

Insbesondere bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die oben definierten Schritte A), B) und C), dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein makroporöses Perlpolymerisat mit einer Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist, einen Porendurchmesser im Bereich von 10 bis 1 000 nm aufweist, die spezifische Oberfläche bestimmt nach BET 5 bis 500 m²/g (ganz besonders bevorzugt 20 bis 200 m²/g) aufweist und aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew-% Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew-% Vernetzer
  - c1) 0 bis 93 Gew-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

20

10

15

in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis  $100 \, \mu m$ , das aus polymerisierten Einheiten aus

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
  - c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

besteht.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Isolierung und/oder Reinigung von Nucleinsäuren unterschiedlicher Herkunft, beispielsweise aus Zellen, Gewebematerialien, Blut oder Infektionserregern geeignet. Vor der Isolierung der Nucleinsäuren wird das

WO 00/49031 - 7 -

5

10

15

20

25

30

zu untersuchende Material durch an sich bekannte Techniken, wie z.B. Aufschluß durch Proteaseverdau aufgeschlossen, wobei eine für die weiteren Schritte A bis C geeignete Probe, ein Lysat, erhalten wird. Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischenschritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologichen Materials. Weitere geeignete Aufschlußverfahren sind in DE-A-4 333 805 beschrieben worden.

PCT/EP00/01028

Es erfolgt das Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, vorzugsweise im Bereich von 2 - 6, besonders bevorzugt im Bereich von 2 - 3 bei Raumtemperatur. Das Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates erfolgt durch z.B. Filtration oder Zentrifugation. Der so gewonnene Komplex aus Nucleinsäure und Polymerisat kann nun durch Waschen mit geeigneten Puffern wie z.B. TE gereinigt werden.

Zur Freisetzung der gebundenen Nucleinsäuren aus dem Komplex erfolgt nun die pH-Einstellung des Komplexes auf pH-Werte oberhalb von 7, vorzugsweise von 8 - 14, besonders bevorzugt im Bereich 12 - 14.

Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate liefern höhere Adsorptions- und Wiederfreisetzungsraten als die löslichen Polymerisate gemäß EP-A-0 707 077. Die Isolierung läßt sich leichter, d.h. mit weniger Arbeitsschritten und in kürzeren Zeiten durchführen. Die Reinheit der isolierten Nucleinsäuren ist höher, insbesondere erhalten sie weniger inhibierende Nebenprodukte, so daß eine Verstärkung der Nucleinsäuren, beispielsweise duch die sogenannte "PCR-Reaktion" und die "RT-PCR" besonders gut gelingt. Auch in Bezug auf Verdau der gewonnenen Nucleinsäuren mittels Restriktionsenzymen ist das erfindungsgemäße Verfahren der in der EP-A-0 707 077 beschriebenen Methode überlegen.

Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die makroporösen Perlpolymerisate, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine mittlere Teilchengröße von 3 bis 100 µm, einen Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und eine spezifische Ober-

fläche gemessen nach BET von 5 bis  $500 \text{ m}^2/\text{g}$  aufweisen und aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- 5 b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

bestehen, sowie

- die in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisate, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine mittlere Teilchengröße von 3 bis 100 μm aufweisen und aus polymerisierten Einheiten von
  - a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

bestehen.

Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung wasserunlöslicher, makroporöser Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m²/g dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

- a) 5 bis 98 Gew.-Teilen Aminomonomer
- b) 2 bis 30 Gew.-Teilen Vernetzer
- c1) 0 bis 93 Gew.-Teilen hydrophobem Vinylmonomer
- d) 10 150 Gew-Teilen Porogen und
- 30 e) 0,1 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

PCT/EP00/01028

in einem wäßrigem Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Porogen durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt,

-9-

5

sowie ein Verfahren zur Herstellung von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

10

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer
- d) 10-150 Gew-Teilen Lösungsmittel und
- e) 0,1 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

15

in einem wäßrigem Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Lösungsmittel durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

20

25

30

Aminomonomere (a) im Sinne der Erfindung sind polymerisierbare, ethylenisch ungesättigte Verbindungen mit mindestens einer primären, sekundären oder tertiären Aminogruppe. Die sekundäre oder tertiäre Aminogruppe kann dabei auch Teil eines cycloaliphatischen oder aromatischen Ringes sein. Beispielhaft seien genannt N-Vinylimidazol, N-Vinylbenzimidazol, 2-Vinylpyridin und 4-Vinylpyridin. Gut geeignete Aminomonomere sind auch die Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure, wie beispielsweise 2-Aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, N-tert.-Butylaminopropylmethacrylat, N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Imidazoyl-propyl)methacrylamid, N-(3-Imidazoyl-propyl)methacrylamid, N-(3-Imidazoyl-propyl)acrylamid, N-(2-Imidazoylethyl)acrylamid, N-(1,1-

Dimethyl-3-imidazoylpropyl)methacrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-imidazoylpropyl)acrylamid, N-(3-Benzimidazoylpropyl)methacrylamid und (3-Benzimidazoylpropyl)acrylamid.

Gut geeignete Aminomonomere sind auch die Umsetzungsprodukte von Isocyanatoethyl(meth)acrylat und Imidazoylalkylaminen, wie beispielsweise das im Rahmen der vorliegenden Erfindung neue Aminomonomer gemäß Formel (I)

10

Weitere geeignete Aminomonomere gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Pyridinderivate der Formeln (II) und (III)

15

Auch Derivate von Styrol und α-Methylstyrol mit Aminogruppen sind gut geeignet. Beispielhaft seien genannt: 4-N,N-Dimethylaminostyrol, 2-N,N-Dimethylaminostyrol, 4-N,N-Diethylaminostyrol und 4-N,N-Bis(2-hydroethyl)aminostyrol.

20

25

Gemäß der vorliegenden Erfindung geeignete Vernetzer (b) sind: Ethylenglycoldimethacrylat, Butandioldimethacrylat, Hexandioldimethacrylat, Pentaerytritoldimethacrylat, 1,2-Glycerindimethacrylat, Triethylenglycoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat, Pentaerytritoltrimethacrylat, Pentaerytritoltetramethacrylat, Ethylenglycoldiacrylat, Butandioldiacrylat, Pentaerytritoldiacrylat, 1,3-Glycerindiacrylat, Triethylenglycol-

15

20

25

30

- 11 -

PCT/EP00/01028

diacrylat, Trimethylolpropantriacrylat, Pentaerytritoltriacrylat, Pentaerytritoltetraacrylat, Allylmethacrylat, Allylacrylat, Methylen-N,N'-bisacrylamid, p-Divinylbenzol und m-Divinylbenzol.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete hydrophobe Vinylmonomere (c1), die in dem erfindungsgemäßen Perlpolymerisat enthalten sein können, sind Acrylsäure-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkylester, Methacrylsäure-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkylester, wie beispielsweise Methylmethacrylat oder Butylacrylat, Acrylnitril, Methacrylnitril, Vinylchlorid, Vinylidenchlorid, Vinylacetat und aromatische Vinylmonomere, wie z.B. Styrol, Vinylnaphthalin, Vinyltoluol, Ethylstyrol, α-Methylstyrol, Chlorstyrole und Vinylbenzylchlorid.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete hydrophile Vinylmonomere (c2) sind beispielsweise: 2-Hydroxyethylmethacrylat, 2-Hydroxypropylmethacrylat, 2-Hydroxypropylacrylat, Triethylenglycolmonomethacrylat, Tetraethylenglycolmonomethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid und N,N-Dimethylacrylamid.

Für das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von wasserunlöslichen makroporösen Perlpolymerisaten werden Porogene eingesetzt. Hierfür sind flüssige mit Wasser nicht mischbare Verbindungen, die die eingesetzten Monomere lösen und das gebildete Polymer ausfällen, geeignet. Beispielhaft seien genannt aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Hexan, Heptan, Octan, Isooctan, Isododekan und Alkohole wie Octanol. Das Porogen wird in Mengen von 10 bis 150 Gew.-%, vorzugsweise von 20 bis 100 Gew% bezogen auf die Summe der eingesetzten Monomere und Vernetzer eingesetzt.

Geeignete Radikalbildner im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise öllösliche Initiatoren. Beispielhaft seien genannt: Peroxyverbindungen wie Dibenzoylperoxid, Dilaurylperoxid, Bis (p-chlorbenzoylperoxid), Dicyclohexylperoxydicarbonat, tert.-Butylperoctoat, 2,5-Bis(2-ethylhexanoylperoxy)-2,5-dimethylhexan

- 12 -

und tert.-Amylperoxy-2-etylhexan, desweiteren Azoverbindungen wie 2,2'-Azobis(isobutyronitril), 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 2,2'-Azobis(2-methylisobutyronitril). Die Initiatoren werden im allgemeinen in Mengen von 0,05 bis 2,5 Gew.-%, vorzugsweise 0,2 bis 1,5 Gew.% bezogen auf die Monomermischung angewendet.

5

10

15

20

25

30

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen gelförmigen und makroporösen Perlpolymerisate werden gegebenenfalls Schutzkolloide in der wäßrigen Phase eingesetzt. Geeignete Schutzkolloide gemäß der vorliegenden Erfindung sind natürliche
und synthetische wasserlösliche Polymere, wie beispielsweise Gelatine, Stärke,
Cellulosederivate, insbesondere Celluloseester und Celluloseether, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure und Copolymerisate aus Acrylsäure, Methacrylsäure, Methacrylsäureestern und/oder Acrylsäureestern. Besonders gut geeignet sind mit Alkalihydroxid neutralisierte Copolymerisate
aus Methacrylsäure und Methacrylsäureester. Die Einsatzmenge der Schutzkolloide
beträgt im allgemeinen 0.05 bis 2 % bezogen auf die wäßrige Phase, vorzugsweise
0.1 bis 1 %.

Die wäßrige Phase kann darüberhinaus gegebenenfalls ein Puffersystem enthalten. Bevorzugt werden Puffersysteme, die den pH-Wert der wäßrigen Phase bei Beginn der Polymerisation auf einen Wert zwischen 12 und 5, vorzugsweise zwischen 10 und 6 einstellen. Unter diesen Bedingungen liegen Dispergiermittel mit Carbonsäuregruppen ganz oder teilweise als Salze vor. Auf diese Weise wird die Wirkung der Schutzkolloide günstig beeinflußt. Besonders gut geeignete Puffersysteme enthalten Phosphat- oder Boratsalze.

Die Menge der Wasserphase beträgt im allgemeinen 75 bis 1200 Gew.-%, vorzugsweise 100 bis 500 Gew.-% bezogen auf die Summe aus Monomeren, Vernetzer und Porogen.

Die Rührgeschwindigkeit bei der Polymerisation ist wichtig für die Einstellung der Teilchengröße. Beim erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren nimmt die Größe der erhaltenen Perlpolymerisate mit zunehmender Rührerdrehzahl ab. Die exakte Rührdrehzahl zur Einstellung einer bestimmten vorgegebenen Perlgröße hängt im Einzelfall stark von der Reaktorgröße, der Reaktorgeometrie und der Rührergeometrie ab. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die notwendige Rührdrehzahl experimentell zu ermitteln. Für Laborreaktoren mit 3-Liter-Reaktionsvolumen, die mit Blattrühren ausgestattet sind, werden bei Verwendung von Copolymerisaten aus Acrylsäure, Methacrylsäure, Acrylsäureestern und/oder Methacrylsäureestern als Dispergiermittel im allgemeinen Perlgrößen von 6 bis 30 μm bei Drehzahlen von 300 bis 500 Upm erreicht.

Die Polymerisationstemperatur des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens richtet sich nach der Zerfallstemperatur des eingesetzten Initiators. Sie liegt im allgemeinen zwischen 50 und 150°C, vorzugsweise zwischen 55 und 100°C. Die Polymerisation dauert 0.5 bis einige Stunden. Es hat sich bewährt, ein Temperaturprogramm anzuwenden, bei dem die Polymerisation bei niedriger Temperatur, beispielsweise 70°C begonnen wird und mit fortschreitendem Polymerisationsumsatz die Reaktionstemperatur erhöht wird.

20

5

10

15

Nach der Polymerisation kann das Polymerisat mit üblichen Methoden, beispielsweise durch Filtrieren oder Dekantieren, isoliert und gegebenenfalls nach ein oder mehreren Wäschen getrocknet werden. Das Porogen kann während der Trocknung entfernt werden. Bei niedrig siedenden Porogenen, wie beispielsweise Hexan ist es auch möglich, das Porogen aus dem wäßrigen Reaktionsgemisch vor dem Isolieren des Perlpolymerisates ganz oder teilweise durch Destillation abzutrennen.

25

30

Die Herstellung der in Wasser quellbaren Perlpolymerisate erfolgt analog der Herstellung der makroporösen Perlpolymerisate, wobei anstelle der hydrophoben Vinylmonomere (c1) hydrophile Vinylmonomere (c2) und anstelle des Porogens ein Lösungsmittel eingesetzt wird.

- 14 -

Geeignete Lösungsmittel sind solche, die mit Wasser nicht mischbar sind, die Monomeren und den Vernetzer lösen und das gebildete Polymerisat nicht ausfällen sondern lösen bzw. quellen. Geeignete Lösemittel sind Toluol, Xylol, Tetrachlormethan, Chloroform, Methylenchlorid, Dichlorethan und. Ethylacetat. Die Menge an Hilfslösemittel beträgt im allgemeinen 10 bis 200 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 150 Gew.-%, besonders bevorzugt 20 bis 100 Gew.-% bezogen auf die Summe aus Monomeren und Vernetzer. Sofern gewünscht kann das Hilfslösemittel nach der Polymerisation beispielsweise durch Destillation abgetrennt werden. Toluol läßt sich besonders einfach durch azeotrope Destillation entfernen.

Die erfindungsgemäßen in Wasser quellbaren Perlpolymerisate haben Quellungsindices von 1,2 bis 12, vorzugsweise 1,5 bis 8 gemessen bei 25°C und pH 7. Als Quellungsindex ist der Quotient aus dem Volumen des bis zur Sättigung in Wasser gequollenen Perlpolymerisates und dem Volumen des wasserfreien Perlpolymerisates definiert.

Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind Mittel zur Isolierung von Nucleinsäuren enthaltend wasserunlösliche makroporöse Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis  $100\,\mu m$ , einen Porendurchmesser von 10 bis  $1\,000\,nm$  und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis  $500\,m^2/g$ , bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- 25 b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

5

10

15

- 15 -

WO 00/49031 PCT/EP00/01028

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer.
- Diese Mittel liegen vorzugsweise als wässrige Dispersionen mit einem Feststoffgehalt von 0,1 50 %, besonders bevorzugt 1 10 % vor. Die wässrige Phase kann gegebenenfalls Puffer enthalten, die vorzugsweise im Bereich von 2 6 wirksam sind.
- Mögliche Einsatzgebiete eines beispielsweise als Testkit formulierten Mittels sind die oben bereits genannten Anwendungsbeispiele, beispielsweise bei der Isolierung von Nucleinsäuren aus Zellen, Gewebematerialien, Blut oder Infektionserregern, wobei besonders alle Fragen der Diagnostik eine Rolle spielen. Als Testkit werden auch die beschriebenen Polymerisate für Routine-Nucleinsäuretests in Mikrotiterplatten und/oder Teströhrchen verstanden oder anderen Formaten wie z.B. im Rahmen der Chiptechnologie.

- 16 -

# **Beispiele**

# Beispiel 1

# 5 Herstellung des Aminomonomers der Formel 1

Zu einer gerührten Lösung aus 50,07 g (0,4 Mol) 3-Aminopropylimidazol, 140 mg 2,6-Di-tert.butyl-4-methylphenol (Stabilisator), 140 mg Dibutylzinndilaurat (Katalysator) in 250 ml Chloroform wurden bei 20°C unter Kühlung 62,08 g (0,4 Mol) 2-Isocyanatoethylmethacrylat innerhalb von 60 Min zugetropft. Anschließend wurde der Ansatz solange auf 50°C erhitzt (ca. 5 h) bis im IR-Spektrum keine NCO-Bande nachweisbar war. Man erhielt 112g Aminomonomer der Formel (I).

# Beispiel 2

15

20

25

30

10

# Herstellung eines gelförmigen Perlpolymerisates

In einem 250ml-Reaktionsgefäß mit Blattrührer, Rückflußkühler, Thermometer, Gaseinlaß- und Gasauslaßrohr wurde eine Lösung aus 5g Polyvinylalkohol (Mowiol® 40-88) und 1,5 g Dinatriumhydrogenphosphat in 130 ml entionisiertem Wasser vorgelegt. Zu dieser wäßrigen Lösung wurde bei 20°C unter Rühren mit 450 Upm eine organische Lösung aus 7,91 g N,N-Dimethylamino-ethylmethacrylat, 7g 2-Hydroxyethyl-methacrylat, 0,17g Triethylenglycoldimethacrylat, 0,225 g 2,2′-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 37,5 g Chloroform innerhalb von 15 min zugegeben. Es wurde leicht mit Stickstoff gespült und die Temperatur auf 67°C erhöht und 20 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen wurde das gebildete Perlpolymerisat durch Dekantieren von der Reaktionsflotte abgetrennt und im Vakuum bei 50°C von Chloroform befreit. Man erhielt 13,5 g Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 20 μm und einem Quellungsindex von 5,1 gemessen bei 25°C in Wasser.

5

10

15

## Beispiel 3

# Herstellung eines makroporösen Perlpolymerisates

In einem 2 Liter-Reaktionsgefäß mit Blattrührer, Rückflußkühler, Thermometer, Gaseinlaß- und Gasauslaßrohr wurde eine Lösung aus 42,5g Polyvinylalkohol (Moviol 40-88) und 12,75 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1240 g entionisiertem Wasser vorgelegt. Zu dieser wäßrigen Lösung wurde bei 20°C unter Rühren mit 280 Upm (Umdrehungen pro Minute) eine organische Lösung aus 23,71 g N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, 13,04 g Styrol, 10,67 g Divinylbenzol, 0,71g 2,2′-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 31,62 g Hexan innerhalb von 30 min bei 25 °C zugegeben. Es wurde leicht mit Stickstoff gespült und die Temperatur auf 66°C erhöht und 20 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Danach wurde bei einer Innentemperatur von 70 bis 98 °C das Hexan abdestilliert. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Perlpolymerisat durch Dekantieren von der Reaktionsflotte abgetrennt und im Vakuum bei 50°C getrocknet. Man erhielt 38 g Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 15 μm und einer spezifischen Oberfläche von 62,3 m²/g.

### 20 Beispiel 4

# Herstellung eines makroporösen Perlpolymerisates

Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei eine organische Lösung aus 23,71 g Aminomo-25 nomer aus Beispiel 1, 13,04 g Styrol ,10,67 g Divinylbenzol, 0,71g 2,2′-Azobis(2,4dimethylvalereonitril) und 38 g Hexan eingesetzt wurde. Man erhielt 35 g makroporöses Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 25 μm und einer spezifischen Oberfläche von 74 m²/g.

# **Biologisches Ergebnis**

10

15

20

- 100 μl Blut wurden mit 10<sup>5</sup> Caski Zellen gemischt. Diese Zellen enthalten das humane Papillomvirus Typ 16 (HPV).
- 5 Zu diesem Gemisch wurden 10 μl einer 2,4 %-igen Partikeldispersion aus Beispiel 2 hinzugegeben.
  - Nach Zugabe von 200 μl eines geeigneten Puffers, beispielsweise TE, erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (TE steht für 10 mMol Tris HCl und 1 mMol Ethylendiamintetraessigsäure pH 7.4 in der Endkonzentration).
  - Die Partikel wurden danach bei 7 000 rpM für 3 min in einer Eppendorfzentrifuge sedimentiert.
  - Zum Sediment wurden nun 200 μl eines geeigneten Lysispuffers, beispielsweise 0,5 % IGEPAL CA-630<sup>®</sup> in TE (IGEPAL CA-630<sup>®</sup> ist ein nichtionisches Detergens, was beispielsweise durch die Firma Sigma, Bestellnummer I 3021 bezogen werden kann), gegeben und erneut für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
    - Statt IGEPAL CA-630® können aber auch andere Lysispuffer eingesetzt werden. Beispielhaft seien hier klassische Verfahren wie mit Protease K Verdau und anschließende Reinigung mittels Phenol/Chloroform oder Natriumlaurylsulfat-Lösungen genannt (Sigma Bestellnummer: L 6026), beispielsweise als 0,5 %ige wässrige Lösung.
  - Es erfolgte die erneute Zentrifugation und Sedimentation bei 7 000 rpM für 3 min in einer Eppendorfzentrifuge.
- Die Partikel wurden anschließend 2 x mit einem geeigneten Puffer (z.B. TE) gewaschen. Nach dem zweiten Waschschritt wurde der Überstand verworfen und nur noch mit den Partikeln weitergearbeitet.
  - Die Freisetzung der an die Partikel gebundenen Nukleinsäure erfolgte durch Einstellung des pH-Wertes auf >12 durch Zugabe von 1 μl 0,5 normaler NaOH.
  - Es schloß sich eine 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur an.

- 19 -

• Nach Zentrifugation (3 min, 7 000 rpM in einer Eppendorfzentrifuge) wurde die Konzentration der gewonnenen Nukleinsäure mittels eines geeigneten Verfahrens, beispielsweise durch Analyse in einem Gelsystem, besonders bevorzugt das "Submerged Gel Nucleic Acid Electrophoresis System", Best.-Nr. 170 4406 der Firma BIO-RAD (webpage: <a href="www.bio-rad.com">www.bio-rad.com</a>), bestimmt. Im Vergleich zu Beads für die Nucleinsäureextraktion, wie sie aus dem Verfahren der EP-A-0 707 077 bekannt waren, wurden mit den erfindungsgemäßen Verfahren und den darin verwendeten Perlpolymerisaten überraschend deutlich bessere Resultate erzielt.

5

15

• 15 μl des so gewonnenen Überstandes wurden nun in eine HPV spezifische PCR (Polymerasekettenreaktion) eingesetzt, das heißt, dass Primer in eine PCR eingesetzt wurde, die spezifisch für humane Papillomviren (HPV) sind. Bei der Analyse des Ergebnisses auf einem Gelsystem konnte die erwartete Nukleinsäurebande klar und deutlich identifiziert werden.

PCT/EP00/01028

# <u>Patentansprüche</u>

1. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe umfassend die nachfolgenden Schritte

- 20 -

5

A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,

10

B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates,

C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,

15

dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist und aus polymerisierten Einheiten von

20

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
- c) 0 bis 93 Gew.- Vinylmonomer

besteht.

- 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials erfolgt.
- Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren umfassend die Schritte A), B)
   und C) gemäß der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymerisat ein wasserlösliches, makroporöses Perlpolymerisat mit einer mittleren

5

15

25

Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu m$  und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m²/g ist und aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
- c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

- in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, das aus polymerisierten Einheiten von
  - a) 5 bis 79,5 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
  - c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

besteht.

- Waserunlösliche, makroporöse Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchen größe von 3 bis 100 μm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m²/g, dadurch gekennzeichnet, daß diese aus polymerisierten Einheiten von
  - a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

bestehen.

- 22 -

5. Wasserunlösliche aber in Wasser quellbare Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, dadurch gekennzeichnet, daß diese aus polymerisierten Einheiten von

PCT/EP00/01028

5

WO 00/49031

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew, % hydrophilem Vinylmonomer

bestehen.

10

15

20

- 6. Verfahren zur Herstellung von wasserunlöslichen, makroporösen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m²/g, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von
  - a) 5 bis 98 Gew-Teilen Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew-Teilen Vernetzer
  - c1) 0 bis 93 Gew-Teilen hydrophobem Vinylmonomer
- d) 10-150 Gew-Teilen Porogen und
  - e) 0,1 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

in einem wäßrigen Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Porogen durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

25

30

7. Verfahren zur Herstellung von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

- a) 5 bis 79,7 Gew% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew% hydrophilem Vinylmonomer
- d) 10-150 Gew-Teilen Lösungsmittel und
- e) 0,1 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

in einem wäßrigen Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Lösungsmittel durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

8. Aminomonomer gemäß Formel (I)

15

5

10

Verfahren zur Herstellung von Aminomonomer der Formel (I) gemäß
 Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet, daß man 2-Isocyanatoethylmethacrylat mit 3-Aminopropylimidazol umsetzt.

20 10. Verwendung von wasserunlöslichen, makroporösen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET

von 5 bis 500 m²/g, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
- c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

- 24 -

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis  $100~\mu m$ , bestehend aus polymerisierten Einheiten von

PCT/EP00/01028

5

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe.

10

- 11. Mittel zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe enthaltend wasserunlösliche makroporöse Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m²/g, bestehend aus polymerisierten Einheiten von
  - a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

20

15

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 μm, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer.